77-83

2545(15)

动 物 学 研 究 1994，15 (1)：77－83 CN 53-1040 / Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

一种改进的阴茎电刺激采精法和猕猴藏酋猴及熊猴的采精及其精液特征的初步研究*

杨上川 季维智 陈建春 商恩缘 邹如金
(中国科学院昆明动物研究所 650223)

Q959.848

A

摘要 本文报道了一种改进的阴茎电刺激采精法，用脱脂棉和铝箔作为电极，以避免直接用金属电极可能对阴茎的损伤，并运用这一方法对猕猴（*Macaca mulatta*）、藏酋猴（*M. thibetana*）和熊猴（*M. assamensis*）进行了电刺激采精及其精液特征研究。电刺激采精模式为连续刺激和间断刺激方式。在采精过程中没有发生阴茎损伤。对初次接受电刺激采精的动物以间断刺激模式效果较好。猕猴、藏酋猴和熊猴的射精体积分别为 2.0±0.1，6.3±1.1 和 3.2±0.6 ml；液化体积分别为 0.7±0.6、2.1±0.4 和 1.7±0.3 ml；精子浓度分别为 12.6±1.2 $\times 10^8$，45.6±5.6 $\times 10^8$ 和 11.5±0.9$\times 10^8$ / ml。3 种动物精液的液化率分别为：猕猴 36.2±0.9%；藏酋猴 34.0±1.4%；熊猴 51.8±1.2%。3 种动物的精子总数与射精体积和凝块体积没有相关性（r^2=0.079；0.016；0.094 和 r^2=0.064；0.020；0.072）。上述结果表明：1）改进的阴茎电刺激采精法适用于猕猴，特别是阴茎表面较为粗糙的藏酋猴和熊猴；2）藏酋猴的射精体积和精子总数是迄今已报道的非人灵长类中最大的，可能是灵长类精子生物学研究的较好的实验材料。

关键词 猕猴，藏酋猴，熊猴，电刺激采精，精液特征

精液

电刺激采精是非人灵长类人工授精、体外授精和精子生物学研究的基本手段。在有关非人灵长类电刺激采精的报道中，阴茎和直肠电刺激采精是较常用的方法(Harrison 等，1980；Cui 等，1991；Lanzendorf 等，1990；Settlage 等，1974；Van Plet 等，1970)。尽管这两种方法已在 18 种非人灵长类电刺激采精中获得成功(Cui 等，1991；Wildt 等，1986)，但仍存在一些问题需要改进。例如直肠刺激有准确放置电极难度较大、冲洗直肠较麻烦和精液容易被尿液污染等缺点(Van Plet 等，1970；Gould 等，1978)；阴茎电刺激采精的金属电极可能会引起阴茎表面烧伤甚至严重的上皮损伤(Settlage 等，1974；Sarason 等，1991)。藏酋猴是我国的特有灵长类动物，熊猴是猕猴属动物中的珍稀种类，其有关电刺激采精和精液特征尚未见报道。进行藏酋猴和熊猴精液基本特征的研究对补充灵长类学基本资料和保护这两种动物有一定的意义。本文对阴茎电刺激采精作了改进，并对猕猴、藏酋猴和熊猴进行了电刺激采精及其精液特征作了初步的比较研究。

* 国家自然科学基金项目，基金批文号 39170109，并得到美国洛克菲勒基金和云南省应用基础基金部分资助
本文 1993 年 5 月 4 日收到，同年 8 月 7 日修回

1 材料和方法

1.1 材料

性成熟的雄性猕猴15只，藏酋猴2只，熊猴2只，不锈钢单笼饲养，光照时间为8: 00至20: 00，食物为颗粒复合饲料，每周2次水果，自由饮水。全部动物均由本所饲养场提供。

1.2 方法

采精器为S44型方波发生器(U. S. A.)。刺激频率设定为17脉冲/s，延迟时间17 ms，波宽17 ms，起始电压0或10 V。电极由铝箔条和脱脂棉条组成，铝箔条宽3—5 mm，长60—80 mm；脱脂棉宽8—12 mm，长80—100 mm。动物用氯胺酮以3—4 mg/kg体重肌肉注射轻度麻醉。把猴子保定为仰式。用脱脂棉条轻轻绕在阴茎基部和近龟头端，再用铝箔条绕在脱脂棉上(切勿使铝箔条与阴茎表皮接触)。阴茎基部环为正极，近龟头端接地。通电刺激前先用生理盐水湿润脱脂棉(吸饱)，并使之与阴茎表面达到最大接触。采用两种刺激方式：

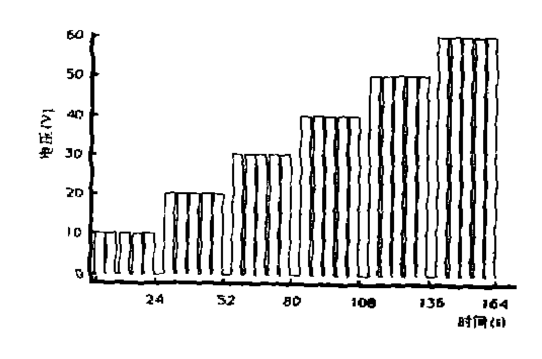


图1 间断刺激模式示意图

电压从10 V升至60 V，每10 V为一组，每组刺激时间为15—25 s，重复5次，每次3—5 s，间隔约1 s，每两组刺激间隔3—5 s

Fig. 1 The pattern of stimulation for electroejaculation of macaques using stepwise increases of voltage from 0–60 V with a rest of 3–5 sec. between stimulations. Each stimulation repeates 5 times, lasted 3–5 sec rested 1 sec. among the stimulations.

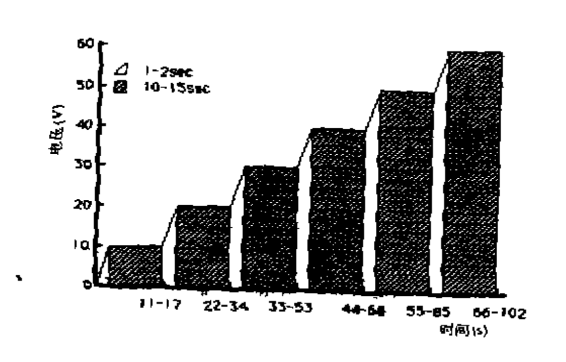


图2 连续刺激模式示意图

电压从0—60 V，每个电压值刺激10—15 s，升高速度为10 V/1—2 s

Fig. 2 The pattern of stimulation for electroejaculation of macaques using consecutive increases of voltage from 0–60 V. The voltage was increased at 10 V/1–2 sec. and lasted 10–15 sec.

1.2.1 间断刺激方式(图1) 电压从10—60 V，每增加10 V为一组，共分为6组.刺激强度从10 V开始，接通电压3—5 s，断开1 s，重复5次，即完成一组刺激。如无射精发生再用20 V、30 V直至60 V以相同方式刺激。如在刺激电压升到60 V时不发生射精，可让猴子休息20—30 s，再从10—60 V进行刺激，可重复6—7次。

1.2.2 连续刺激方式(图2) 电压从0—60 V，以5—10 V/s的速度升高电压，每增加

10 V 持续刺激 10—15 s，然后再以相同速度增加 10 V，直至 60 V。若有必要可进行 6—7 次刺激，每两次刺激之间让猴子休息 20—30 s。不论用哪种方式刺激，猴子产生射精时停止刺激。

收集到的精液样品在室温下孵育 30—35 min 后分离液体部分，测出液化体积、凝块体积。用 TH 培养液(Bavister 等，1983) 稀释液化部分(一般 1：1000)，再用血球计数板在显微镜下观察精子形态及运动方式，并计算出精子浓度、正常形态精子和运动精子的比例（%）。用变量分析和相关分析进行统计学处理。

2　结果

用本文方法对 15 只猕猴、2 只藏酋猴和 2 只熊猴进行的阴茎电刺激采精分别收集到 40、11、7 份样品。在采精过程中，猴子极少有紧张和痛苦反应。尽管熊猴和藏酋猴阴茎表面极为粗糙，在必要时，即使是连续 7 次重复刺激，也没有发生对阴茎的损伤，动物能很快适应这种刺激。

表 1　猕猴、藏酋猴和熊猴电刺激采精精液参数

Tab. 1　Semen parameters of the Rhesus, Tibetan and Assamese macaque

种　名	样品数	射精体积	液化体积	浓度 ($\times 10^8$)[a]	精子总数 ($\times 10^6$)	液化率	活动度%	正常精子%
猕猴 *M. mulatta*	40	2.0 ± 0.1	0.7 ± 0.6	12.567 ± 1.189	9.946 ± 1.389	36.20 ± 0.92	84.825 ± 1.353	77.757 ± 1.454
		(0.7—4.1)	(0.2—1.5)	(3—40)	(0.846—48)	(27.8 ± 53.8)	(61—97)	(51—95)
藏酋猴 *M. thibatana*	11	6.3 ± 1.1**	2.1 ± 1.4**	45.559 ± 5.620^{**+}	119.391 ± 20.73^{**++}	34.01 ± 1.37	82.073 ± 2.933	78.182 ± 4.455
		(2.2—13.9)	(0.7—4.8)	(59—94.3)	(28—232.56)	(22.8—38.9)	(59—94.3)	(51—92)
熊猴 *M. assamensis*	7	3.2 ± 0.6	1.7 ± 0.3**	11.486 ± 0.926	18.582 ± 0.967*	51.83 ± 1.25^{**++}	81.143 ± 2.963	74.429 ± 5.084
		(2.2—5.3)	(1.2—2.7)	(7—14.3)	(15.73—21.29)	(46.7—57.0)	(52—88)	(52—88)

Mean ± SE 平均值 ± 标准误

* 猕猴与藏酋猴、熊猴比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$　　+ 藏酋猴与熊猴比较，++：$P<0.01$

a 液化部分的精子浓度 = 精子数 / 液化体积

藏酋猴和熊猴每次射精时，都出现阴茎非常明显的充血勃起，龟头极度膨大，阴茎持续而有力的节律性搏动，精液随阴茎的搏动同步喷射而出。最先射出的部分呈液态，在烧杯内凝固，随后射出部分在离开尿道口时即刻凝固，形成不规则凝块。最后射出部分则是在尿道内已凝固的柱状凝块；猕猴射精时，阴茎的勃起，龟头的膨大，阴茎的搏动均较微弱。最初精液为不明显喷出，最后则是流出，并且全部在烧杯内凝固。上述现象表明，藏酋猴和熊猴的射精比猕猴的射精完全而且精液凝结速度比猕猴的快。

3种猴子的精液参数见表1。变量分析表明，藏酋猴射精体积(6.3 ml)，液化体积(2.1 ml)、精子浓度(45.599×10^8)和精子总数(119.391×10^8)最大，与猕猴的射精体积(2.0 ml)、液化体积(0.7 ml)、精子浓度(12.567×10^8)和精子总数(9.946×10^8)有显著差异($P<0.0001$)；与熊猴精子浓度(11.486×10^8)、精子总数(18.582×10^8)有显著差异($P<0.005$，$P<0.01$)。熊猴的射精体积(3.2 ml)、液化体积(1.7 ml)和精子总数(18.582×10^8)与猕猴亦有显著差异($P<0.025$，$P<0.0001$、$P<0.05$)。液化率（液化体积／射精体积×100）以熊猴最高(51.8%)，与藏酋猴(34.0%)，猕猴(36.2%)有显著差异($P<0.0001$)。精子活动度百分率分别为84.8、82.1和81.1、正常形态百分率为别为77.8，78.2和74.4，三者均无显著差异(见表1)。相关分析表明猕猴、藏酋猴和熊猴的精子总数与射精体积和凝块体积没有相关性($r^2=0.079$，0.016，0.094；$r^2=0.064$，0.020，0.072 图3)。

3 讨论

直接阴茎电刺激采精在非人灵长类中是较常用的方法(Lanzendrof等，1990；Settlage等，1974；Valerio等，1970；Van Plet等，1970)，并多用铝箔、铜网等金属电极。Lanzendorf等(1990)的研究指出，阴茎电刺激可能与阴茎，电极之间的接触状况以及阴茎表皮阻抗有关。由于不同动物阴茎结构不同，阴茎和电极之间的接触状况以及阴茎表皮阻抗不同。金属电极可能会产生因局部电流过大使阴茎表皮烧伤甚至造成上皮损伤(Settlage等，1974)。Sarason等(1991)用非金属电极对猕猴和食蟹猴采精，避免了阴茎的损伤。藏酋猴和熊猴阴茎近龟头端和龟头后缘背侧分布有密集的刺状角质乳头、在采精时要使电极(特别是金属电极)与阴茎表面均匀接触几乎不可能。这样在电刺激时容易产生局部电流过大损伤阴茎。在本研究中利用脱脂棉使电极与阴茎有良好的接触，避免了局部电流过大损伤阴茎现象。对3种猴子的采精效果从没有阴茎损伤和获得的精液量较大看，这一方法比金属电极采精有更大的优越性，与非金属电极采精的效果相似(Sarason等，1991)。关于连续刺激和间断刺激方式，在先前的非人灵长类的报道都较为成功(Harrison等，1980；Cui等，1991；Lanzendorf等，1990；Valerio等，1970；Van Plet等，1970)。我们的经验是，对首次接受电刺激采精的猴子可单独用间断刺激模式或先用间断刺激再用连续刺激方式。这样有利于猴子适应这种刺激，从而得到较高的采精成功率。如果发生射精就表明猴子在很大程度上适应了这种刺激，以后再次采精时只需要刺激1次或是较少的刺激次数就可产生射精，而且此时用连续刺激方式效果更好。此外，采精的成功率还与麻醉的深浅以及采精过程中掌握电压升高的经验有关。

本文首次报道了藏酋猴和熊猴的精液特征。从表1所列的结果可看出，猕猴的精液特征与先前有关的报道相似(Lanzendorf等，1990；Sarason等，1991；Van Plet等，1970)。藏酋猴的射精体积(6.3 ml)和精子浓度(45.559×10^8)均大于迄今为止所报道的18种非人灵长类的射精体积和精子浓度，熊猴的射精体积和精子总数也较猕猴大。这是占存在种间差异，还是与采精方法有关，待进一步研究。

关于非人灵长类精子数量与射精体积和凝块体积间是否有相关性尚不清楚。大多数非人灵长类射出的精液由液体和凝块组成。精液在射出后很快凝固，凝块的产生是由于前列腺颅叶和精囊腺分泌物发生反应的结果(Duklelow，1971)，因此，发生这种反应的精液由两部分组成：固体胶状凝块，这部分随后要不完全液化；另一部分是含有精子的液体

(Lanzendorf 等，1990)。精液的凝固和液化可能与其内含的酶有关。从大鼠凝结腺中移出的酶能够凝结猴子的精液，从猕猴前列腺颅叶提取的酶也能凝结大鼠的精液。对人的研究认为，有关精液凝固代谢的酶产生于精囊腺，而有关精液液化的物质来源于精囊腺和尿道球腺的分泌(Hafez，1980)。Sarason 等(1991)对食蟹猴采精的研究发现，食蟹猴射精体积显著小于猕猴，不产生大体积的凝块，但精子总数与猕猴相近，无显著差异。Lanzendorf 等(1990)的研究未发现猕猴的射精体积、凝块体积与精子数量有相关关系。本项研究通过相关分析、3 种动物的精子数量与射精体积和凝块体积无相关关系(图 3)。

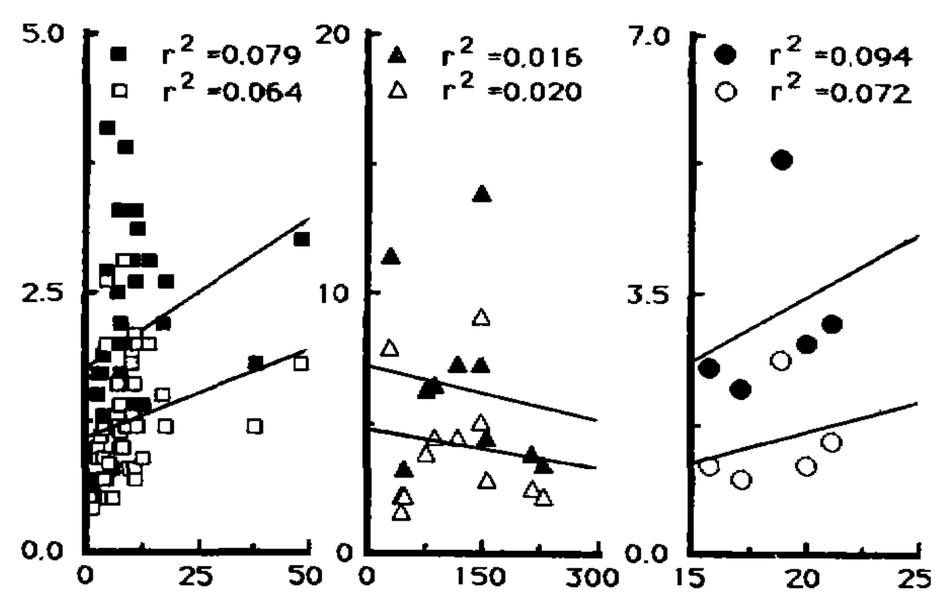


图 3　猕猴、藏酋猴和熊猴精子总数与射精体积、凝块体积的相关分析

Fig. 3　Correlative analysis between the sperm number and the amount of coagulum or the volume of semen in the Rhesus, Tibetan and Assamese macaques

Y = 体积(ml)　X = 精子总数 × 10^8　Y = Volume(ml)　X = sperm number × 10^8

■ 猕猴射精体积(ejaculated volume of Rhesus monkey)　□ 猕猴凝块体积(coagulum volume of Rhesus monkey)

▲ 藏酋猴射精体积(ejaculate volume of Tibetan macaque)　△ 藏酋猴凝块体积(coagulum volume of Tibetan macaque)

● 熊猴射精体积(ejaculate volume of Assamese macaque)　○ 熊猴凝块体积(coagulum volume of Assamese macaque)

熊猴精液液化百分率(51.83 ± 1.25)显著高于藏酋猴(34.01 ± 1.37)和猕猴(36.20 ± 0.92)。Settlage 等(1970)对猕猴的研究结果为，凝块占射精体积的 55%—68%。Valerio 等(1970)的研究结果为食蟹猴精液凝块占射精体积的 43%，而 Sarason 等(1991)的研究发现食蟹猴精液不产生大体积的凝块。熊猴精液凝块占射精体积的 43%—52%，明显地小于藏酋猴的 61%—77% 和猕猴的 46%—71%，这可能是存在动物种间差异。藏酋猴和熊猴精液射出后比猕猴凝固得快，是否与不同物种精液凝固代谢的酶含量有关，还待进一步研究。

参考文献

Bavister B D *et al* 1983 Development of preimpantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol Reprod, **28** 235–247

Dukelow W R 1971 Semen and artificial insemination. In ESE Hafez (ed)· "Comparative reproduction of nonhuman primates."Springfield, IL: Chalrs C Thomas, 115–127.

Gould K G. 1978. Rectal probee electroejaculatiom of primates. *J Med Primatol*, 7: 213–222.

Hafez, ESE. 1980. Human Reproduction, 91–122 HARPER & Row, PUBLISHERS.

Harrison R M. 1980. Semen paraeters in *Macaca mulatta*· Ejaculates from random and selected monkeys. *J Med Primatol* **9**: 265–273.

Ke–Hui Cui *et al*. 1991. Collection and Analysis of Semen from the Common Marmoset (*Callithris jacchus*). *J Androl*. **12**: 214–220.

Lanzendorf S E *et al*. 1990. Collection and quality of rhesus monkey semen. *Molecular reproduction* and *development*. **25**: 61–66.

Sarason R L *et al*. 1991. The use of nonmetal electrodes in eledtroejaculation ofrestrained but unanesthetized macaques. *J Med Primatol*. **20**: 122–125.

Settlage DSF 1974. Observation on coagulum characteristics of the rhesus monkey electroejaculate. Biol Reprod, **11**. 619–623

Settlage DSF, Hendrickx A G. 1974. Electroejaculation technique in *Macaca mulatta* (rhesus monkeys). Fertil Steril, **25**: 157–159

Valerio D A *et al*. 1970. Semen evaluation in macaques. Lab Anim Cara, **20**: 734–740.

Valerio D A. 1975. Experiences in the laboratory of nonhuman primates. Laboratory Animal Handbooks, **6**. 49–62

VanPlet L F, Philip E K 1970. Observation on semen collection and quality in macaqeus. Lab Anim Care, **20**: 726–733

Wildt D E. 1986 Spermatozoa: Collection, Evaluation, Metabolism, Freezing, and Artificial insemination. In WR Dukelow(ed) Reproduction and Development New York: Alan R. Liss, Inc. 171–193.

THE USE OF IMPROVED PENILE ELECTROEJACULATION IN RHESUS, TIBETAN AND ASSAMESE MACAQUES AND STUDY ON THE PARAMETERS OF THEIR SEMEN

Yang Shangchuan Ji Weizhi Chen Jianchun Shang Enyuan Zou Rujin

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica* 650223)

Abstract

An improved penile electroejaculation using absorbent cotton and aluminum as elec-

trodes to avoid the small superficial burns or more serious lesions was employed on the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*), Tibetan macaque (*M. thibetana*) and Assamese macaque (*M. assamensis*) and the semen parameters of the animals was compared in the present study. The pattern of stimulation for ejaculation was stepwise and consecutive increasing of voltage. No penile burns or lesions resulted from the electroejaculation procedures. It was effective to use the pattern of stepwise stimulation for the animals at the first on the penile elctroejaculation. Semen parameters of ejaculates obtained by the method from rhesus, Tibetan and Assamese macaques were as follows, semen volume(ml): 2.0 ± 0.1, 6.3 ± 1.1 and 3.2 ± 0.6; liquefaction(ml): 0.7 ± 0.6, 2.1 ± 0.4 and 1.7 ± 0.3; concentration ($\times 10^6$ / ml): 12.6 ± 1.2, 45.6 ± 5.6 and 11.5 ± 0.9; coagulum liquefaction rate (%): 36.2 ± 0.9, 34.0 ± 1.4 and 51.8 ± 1.2, respectively. No correlation was established between the sperm number and the amount of coagulum or the volume of semen ($r^2 = 0.079$; 0.016; 0.094; and $r^2 = 0.064$; 0.020; 0.072, respectively) in the three species. These results indicate that: 1) the improved penile electroejaculation is suited to rhesus monkey, especially to Tibetan and Assamese macaques with the rough penile surface; 2) The semen volume and sperm number of the Tibetan macaque are the largest in the nonhuman primates compared with the previous reports. Its semen may be a good materials for study on spermatology.

Key words *Macaca mulatta*, *Macaca thibetana*, *Macaca assamensis*, Electroejaculation, Semen parameters